Aus der Hautklinik der Freien Universität Berlin
im Rudolf Virchow-Krankenhaus
Direktor: Prof. Dr. med. G. Stüttgen

Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur in vitro- und in vivo-Permeation von Medikamenten an der Haut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Bartel Dietzmann
Berlin

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0118

Aus der Hautklinik der Freien Universität Berlin
im Rudolf Virchow-Krankenhaus
Direktor: Prof. Dr. med. G. Stüttgen

Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur in vitro- und in vivo-Permeation von Medikamenten an der Haut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Bartel Dietzmann
Berlin

Referent: Prof. Dr. med. G. Stüttgen

Korreferent: Prof. Dr. med. N. Rietbrock

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 21.6.1973

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material	5
Methodik der Penetrationsversuche	8
Errechnung der Ergebnisse	9
Penetration in vitro	10
Penetration in vivo	11
Ergebnisse	12
Diskussion	34
Zusammenfassung	39
Literatur	41
Lebenslauf	44

Diese Arbeit wurde dankenswerterweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

KLINISCH-EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR IN VITRO- UND IN VIVO-PERMEATION VON MEDIKAMENTEN AN DER HAUT

Einleitung

Eine der wesentlichen Voraussetzungen für die therapeutische Wirkung von Medikamenten ist eine ausreichende Penetration und ein Transport in aktiver Konzentration an den beabsichtigten Wirkort.

Diese allgemein gültige Grundregel trifft nicht nur auf intern angewandte Medikamente zu, sondern auch auf extern zu applizierende Pharmaca, wie sie in der Dermatologie ständig gebraucht werden. Nun setzt die Haut als Schutzorgan der Umwelt gegenüber einer Penetration chemisch definierter Substanzen erhebliche Widerstände entgegen. So weiß man, daß speziell die Barrierezone in der Hornschicht die Penetration von sehr vielen Stoffen, also auch von Pharmaca, auf eine geringe Menge begrenzt.

Voraussetzung für die therapeutische Wirkung ist demzufolge entweder, daß das Medikament auch noch in geringsten Dosen wirksam ist oder daß man Möglichkeiten findet, die Penetration von Pharmaca zu verstärken.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, allgemeine Regeln über die Penetration von Medikamenten in die Haut aufzustellen (1, 2). Die Schwierigkeit bei derartigen Untersuchungen liegt jedoch stets darin, daß Tierexperimente kaum gültige

Aussagen über die Penetration in die menschliche Haut zulassen, da die Tierhaut eine andersartige Schichtung aufweist; es werden demzufolge an der Tierhaut in vielen Fällen entweder überhöhte oder zu niedrige Penetrationsraten im Vergleich zur Penetration einer menschlichen Haut gefunden. Gültige Aussagen sind demzufolge nur von der klinisch-experimentellen Pharmakologie zu erwarten.

Prinzipiell sind zwei Wege zum Studium der Penetration möglich:

Erstens kann man die pharmakologische Aktivität an einem definierten Wirkort als Maß für die Penetrationsrate heranziehen, so wird z. B. beim McKenzie-Test (3) die vasokonstriktorische Wirkung der Corticosteroide zur Beurteilung der Penetration verwandt. Es gilt jedoch zu bedenken, daß auf diesem Wege lediglich die Aktivität des Steroids an einer definierten Schicht, nämlich der gefäßführenden Schicht, erfaßt werden kann. Eine Aussage über die Verteilung in Bezug auf mehrere Hautschichten bzw. auf die Quantität des in die Tiefe gelangenden Steroids ist nicht möglich, da, wie Tronnier (4) und andere zeigten, Aktivität und Quantität nicht in einem direkten Zusammenhang miteinander stehen müssen.

Als zweite Möglichkeit bietet sich die quantitative Verfolgung der Penetration an. Dies geschieht vielfach noch in der Weise, daß man ein Medikament auf die Haut appliziert und anschließend die Menge erfaßt, die nach einer bestimmten Zeit im Harn erscheint (5). Jedoch sind aus solchen Untersuchungen nur sehr indirekte Schlüsse möglich, da

die Frage der Verteilung über verschiedene Hautschichten wiederum unberührt bleibt, außerdem Medikamente im Organismus zumeist umgewandelt werden (6, 7) und sich so einer quantitativen Erfassung im Harn entziehen können. Eine wesentliche Erleichterung stellt hier die Verwendung von radioaktiv markierten Medikamenten dar, da so auch Metaboliten erfaßt werden können. Mit Hilfe autoradiographischer Techniken ist es nun auch möglich, die Verteilung von Medikamenten in den Hautschichten qualitativ zu untersuchen (8).

Man nutzt hier den Umstand aus, daß in histologischen Schnitten die Radioaktivität einen aufgelegten oder aufgetragenen lichtempfindlichen Film zu schwärzen vermag. Die Schwärzungszonen geben die Orte der höchsten Konzentration der Medikamente an. Quantitative Aussagen sind auf diesem Wege kaum möglich, da der Schwärzungsgrad von der Belichtungsdauer, der Schnittdicke und der Strahlungsintensität des Isotops abhängig ist.

Aus dem Vorgesagten ergibt sich konsequenterweise die Notwendigkeit, die Quantität eines durch Penetration aufgenommenen Medikamentes durch getrennte Untersuchungen der einzelnen Hautschichten zu erfassen (9, 10).

Dies ist wiederum am besten durch radioaktiv markierte Medikamente möglich. Untersucht man außer der Verteilung in der Haut zusätzlich die Aktivität im Serum und im Harn, so ist eine Aussage über das Schicksal eines Medikamentes und seine Verweildauer im Gesamtorganismus

möglich. Eine große Schwierigkeit bei derartigen Untersuchungen liegt darin, eine ausreichende Zahl von Applikationen radioaktiv markierter Medikamente an Patienten vornehmen zu können.

Basierend auf der Vorstellung, daß die Penetration von Substanzen durch die Haut in erster Näherung den Diffusionsgesetzen gehorcht (1), mit anderen Worten, daß sich die Haut wie eine normale physikalische Membran verhält, hat man demzufolge zahlreiche Untersuchungen an excidierter Haut oder Leichenhaut durchgeführt. Es erhebt sich jedoch die Frage, ob selbst unter strengster Beachtung physiologischer Bedingungen ein in vitro-Experiment, wie es das Arbeiten mit excidierter Haut z. B. in Penetrationskammern darstellt, verläßliche Aussagen über Penetrationsmodus und -zeit an dem Patienten zuläßt (11).

Hiervon ausgehend ergab sich als Themenstellung für die vorliegende Arbeit, einen Vergleich zwischen der in vivo-Penetration und in vitro-Untersuchungen unter möglichst optimalen und vergleichbaren Bedingungen anzustellen.

Ein derartiger Vergleich ist nur dann zulässig, wenn er nicht nur (möglicherweise zufällig) auf ein einzelnes Medikament zutrifft, sondern wenn die Ergebnisse von in vitro-Untersuchungen sich generell auf die in vivo-Verhältnisse übertragen lassen, mit anderen Worten: entweder müßten die Penetrationsquoten in diesem Vergleich immer dieselben sein, oder es müßte sich zumindest ein für alle Substanzen konstantes Verhältnis zwischen der in vitro- und

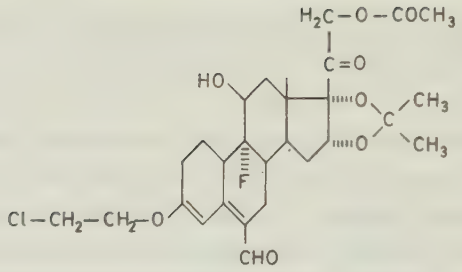
in vivo-Penetration ableiten lassen.

Wegen der vorher genannten Schwierigkeiten in Bezug auf die ausreichende Anzahl von Untersuchungen in vivo wurden nun zunächst zwei Medikamente in Betracht gezogen, die sich sowohl chemisch als auch pharmakologisch grundlegend von einander unterscheiden, nämlich ein synthetisches Corticosteroid sowie ein Antibioticum. Insgesamt ergab sich damit folgende Fragestellung: Zeigen beide miteinander nicht verwandte Medikamente jeweils in vitro den gleichen Penetrationsmodus wie in vivo; wenn nicht, ergibt sich für beide ein konstantes Verhältnis zwischen der in vitro und der in vivo-Penetration?

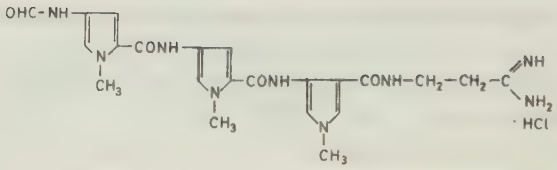
Material: Zur Verfügung standen zwei tritium-markierte Verbindungen

1.) das fluorierte Corticosteroid Fluoroformylon, das als Besonderheit in der 6-Stellung eine Formylgruppe aufweist,

2.) das cytostatisch wirksame Antibioticum Distamycin, in dem vier Pyrrolgruppen peptidartig miteinander verbunden sind. Auch Distamycin weist eine Formylgruppe auf.



Fluoroformylon



Distamycin A-Hydrochlorid

Die beiden Substanzen unterscheiden sich vor allen Dingen dadurch, daß, wie die Strukturformeln zeigen, das Antibioticum sehr viel polarer ist als das Corticosteroid. Das Fluoroformylon hatte eine spezifische Aktivität von 270 µC/g Salbe, die Konzentration an Steroid (markiert und unmarkiert) war 0.1 %. Die spezifische Aktivität des Distamycin betrug 103 µC/g Salbe bei einer Gesamtkonzentration von 1.0 %.

Für alle im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden die reinsten, im Handel erhältlichen Chemikalien verwandt. Die Radioaktivitätsmessungen wurden als Flüssigkeitszintillationsmessungen durchgeführt. Als Cocktail, später "Diotol" genannt, diente folgende Mischung:

260 g	Naphtalin
16.75 g	PPO (2.5 Diphenyloxyzol)
0.325 g	POPOP (2.2-p-Phenylen-bis (5-phenyloxazol))
1.25 l	Toluol
1.25 l	Dioxan
0.75 l	Methanol

Für die Tesafilm-Abrisse wurde Tesafilm Nr. 104 der Firma Beiersdorf 3 cm breit benutzt.

Methodik der Penetrationsversuche:

Die Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Philips Liquid Scintillation-Counter mit angeschlossenem Rechner und Drucker durchgeführt. Nach Erstellung und Eingabe einer Quench-Kurve wurden die Ergebnisse jeweils in dpm ausgedrückt (dpm = Zerfälle/min.). Eine Errechnung in cpm, d. h. Zählimpulsen pro Minute, ist deshalb nicht sinnvoll, weil die Substanzen verschiedenen chemischen Charakter sowie verschiedene Markierungsgrade aufweisen.

Errechnung der Ergebnisse:

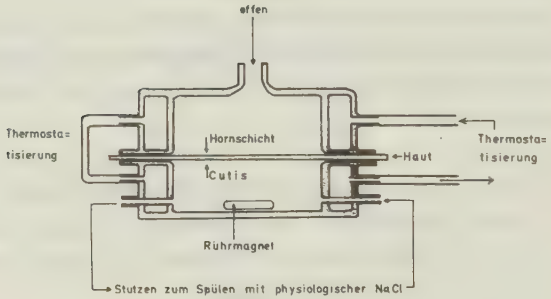
Die erhaltenen Ausbeuten in dpm wurden jeweils auf die Größe der Auftragfläche bezogen. Zur Verdeutlichung der Verteilung in den einzelnen Hautschichten wurden diese Werte nun zunächst in ein halblogarithmisches Millimeterpapier eingetragen, um eine evtl. Kumulation in bestimmten Hautschichten erkenntlich zu machen.

Insgesamt erfolgte die Errechnung der prozentualen Verteilung in den verschiedenen Schichten jeweils nach zwei Gesichtspunkten:

1.) wurde die absolute Quantität der Markierung jeweils in der Hornschicht, der Epidermis, der Cutis, im Serum sowie im Harn in Prozent der gesamten aufgetragenen Aktivität errechnet.

2.) wurden die in den jeweiligen Hautschichten, im Serum sowie im Harn wiedergefundenen Aktivitäten addiert und gleich 100 %, d. h. gleich gesamt wiedergefundene Aktivität gesetzt und dann die Aktivität in den einzelnen Kompartimenten jeweils in Prozent dieser gesamt wiedergefundenen Aktivität ausgedrückt.

a) Penetration in vitro: Bei frisch excidierter oder über kurze Zeit eingefrorener Haut (Mamma-Ablatio) wurden jeweils ca. 40 mg Salbe auf 7 cm^2 Haut gleichmäßig verteilt. Die so behandelte Haut wurde sofort in die Penetrationskammer eingespannt.



Zur Unterseite hin, also zur Cutis, wurde die Kammer mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, diese wurde durch einen Magnetrührer in gleichmäßiger Bewegung gehalten.

Die Oberseite, d. h. die Hornschicht, hatte durch die in der Zeichnung sichtbare Öffnung Luftzutritt.

Die Durchflußräume der Penetrationskammer wurden mit 37 Grad warmem Wasser durchspült und somit thermosta-

tisiert. Nach der in den folgenden Tabellen jeweils gezeigten Einwirkungszeit wurde die Haut herausgenommen und mit einem Gefriermikrotom durch Schnittführung parallel zur Hautoberfläche in ihre einzelnen Schichten zerlegt.

Bei einer Gesamtdicke der Epidermis von ca. 200 µ wurden die ersten 20 Schnitte, etwa der Stärke der Epidermis entsprechend, zur besseren Penetrationskontrolle in Abständen von 10 µ und die folgenden bis zur vollständigen Aufarbeitung des Hautpräparates in Abständen von 40 µ ausgeführt.

b) Penetration in vivo: Die in vivo-Versuche wurden vor dermatologischen Operationen in der Hautklinik des Rudolf-Virchow-Krankenhauses vorgenommen. Die Größe der Hautfläche betrug jeweils 28 cm^2, die aufgetragene Salbenmenge ca. 100 mg, die Salbe wurde in den angegebenen Zeiträumen vor der Operation aufgetragen.

Eine Gruppe von Salbenaufstrichen wurde mit einem "offenen" Verband, lediglich durch eine perforierte Metallschale geschützt, versehen. Eine zweite Gruppe erhielt einen Occlusionsverband.

Nach der angegebenen Zeit und kurz vor der Excision wurde die Hornschicht durch Tesastrips in Schichten abgetragen; sofort nach der Excision erfolgte die Aufarbeitung der Haut durch Horizontalschnitte, wie bereits bei den in vitro-

Versuchen beschrieben vgl. (9, 10).

Ergebnisse:

1 a) In vitro-Untersuchungen von Fluoroformylon:

Nach der kürzesten Zeit (15 Min.) ist, wie die Tabellen I und II zeigen, das Corticosteroid lediglich in die Hornschicht eingedrungen. In Epidermis und Cutis war noch keine Aktivität nachweisbar. Nach 35 Min. erscheinen erste, wenn auch geringe Aktivitäten in Epidermis und Cutis. Bei der prozentualen Verteilung muß selbstverständlich bedacht werden, daß die Epidermis im Vergleich zur Cutis recht dünn ist, ca. 100 - 150 µ im Vergleich zu ca. 1,5 mm. In Bezug auf die Schichtdicke ist somit die Aktivität in der Epidermis weitaus höher als in der Cutis. Nach ca. 100 Min. ist anscheinend in der Epidermis und der Cutis das Maximum der Penetration erreicht, denn längere Zeiten, siehe Versuch 4 und 5, ergeben keine weiteren Erhöhungen der Aktivitäten in diesen Schichten. Die maximale absolute Penetrationsrate unter Einschluß der Hornschicht war unter diesen Bedingungen ca. 65 % der aufgetragenen Menge. Sowohl Tabelle I als auch Tabelle II zeigen, daß der allergrößte Teil von Fluoroformylon in der Hornschicht verbleibt. Von dort aus diffundieren maximal 1.5 %

in die Tiefe.

Über den Verteilungsmodus in den einzelnen Schichten der Haut gibt die folgende Abbildung (1 a - 1 c) Auskunft.

Penetration von Fluoroformylon in die Hornschicht nach 100 Min. Darstellung im halblogarithmischen Maßstab in Abhängigkeit von der Anzahl der Tesa-Film-Abrisse bzw. von der Schichttiefe

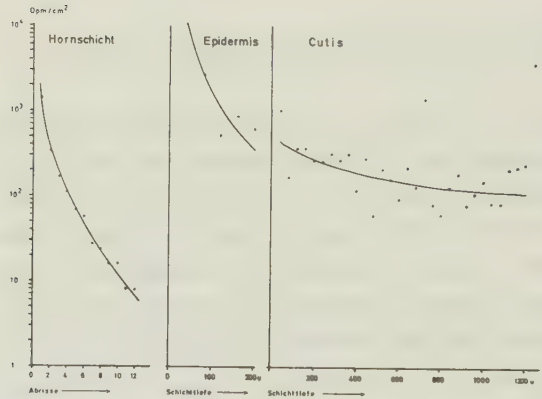


Abb. 1 a

Ordinate = wiedergefundene Aktivität von Fluoroformylon in der Hornschicht.
Abszisse = Anzahl der zur Abtragung der Hornschicht verwendeten Tesastrips.

Abb. 1 b

Ordinate = wiedergefundene Aktivität von Fluoroformylon in der Epidermis.
Abszisse = abgetragene Schichtdicke in µ.

Abb 1 c

Ordinate = wiedergefundene Aktivität von Fluoroformylon in der Cutis.
Abszisse = abgetragene Schichtdicke in µ; in vitro-Untersuchungen bei offener Penetrationskammer.

Tab. I:

Penetration von Fluoroformylon in vitro; % der aufgetragenen Menge

Zeit	Versuch-Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
15'	3	38, 5	0	0
35'	1	61,7	0,045	0,059
105'	2	64,5	0,507	0,33
305'	4	36,4	0,53	0,087
1005'	5	28,4	0,4	0.2

Tab. II:

Penetration von Fluoroformylon in vitro; % der wiedergefundenen Menge

Zeit	Versuch-Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
15'	3	100,0	0	0
35'	1	99, 85	0,07	0,08
105'	2	98, 8	0,70	0,50
305'	4	98, 3	1,44	0,237
1005'	5	98, 1	1, 38	0,55

Wie die Abb. 1 zeigt, ergibt sich ein gleichmäßiger Aktivitätsabfall von der Tiefe der Hornschicht, für einen Stau etwa vor der Barriere ergibt sich kein Anhalt, Abb. 1 a.

Für die entsprechende Verteilung in Abhängigkeit von der Schichttiefe der Epidermis sowie der Cutis ergaben sich folgende Abbildungen:

Abb. 1 b: Verteilung von Fluoroformylon nach 100 Min. in der Epidermis und Abhängigkeit von der Schichttiefe ausgedrückt in 10 µ Schnitten, desgleichen Legende Cutis Abb. 1 c.

In beiden Fällen zeigen die Abbildungen eine ziemlich gleichmäßige Verteilung der Aktivität über die gesamten Schichttiefen in Epidermis und Cutis.

Es muß daher angenommen werden, daß in der Zeit von 100 Min. schon eine ausreichende Verteilung durch Hin- und Rückdiffusion stattgefunden hat, so daß kein Gradient in Abhängigkeit von der Schichttiefe mehr zu erkennen ist.

Dies gilt gleichermaßen für die längeren Zeiten, so daß sich Darstellungen entsprechender Kurvenverläufe von den 300 und 100 Min.-Versuchen erübrigen.

In Abb. 2 sind nun die Verhältnisse in der Hornschicht in Abhängigkeit von der Applikationsdauer aufgezeichnet.

Auch hier ergibt sich, daß das Penetrationsmaximum in etwa nach 100 Min. erreicht ist. Der anschließende leichte

Abfall ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß sich in der langen Zeitdauer der Penetration inzwischen schon eine gewisse Menge der markierten Substanz in der unterhalb der Cutis befindlichen physiologischen Kochsalzlösung angesammelt hat.

Dies ließ sich dadurch bestätigen, daß die Aktivität in dieser Kochsalzlösung in Abhängigkeit von der Zeit deutlich ansteigt.

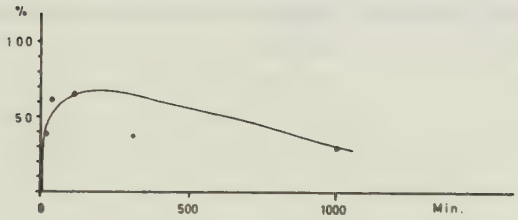


Abb. 2
Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Fluoroformylon in der Hornschicht.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vitro-Untersuchung.

In Abb. 3 ist die Menge des in die Epidermis eingedrungenen Fluoroformylon in Abhängigkeit von der Applikationsdauer aufgetragen.

Das Penetrationsmaximum liegt verständlicherweise zu einem etwas späteren Zeitpunkt als in der Hornschicht, im übrigen ergeben sich die gleichen Verhältnisse.

Wie aus Tab. II zu ersehen ist, wiederholen sich diese Gegebenheiten mit einem Maximum um ca. 100 Min. auch in der Cutis.

Zusammengefaßt ergibt sich damit, daß Fluoroformylon nach ca. 100 Min. sein Penetrationsmaximum mit ca. 65 % erreicht, wobei der größte Anteil auch nach dieser Zeit in der Hornschicht verblieben ist.

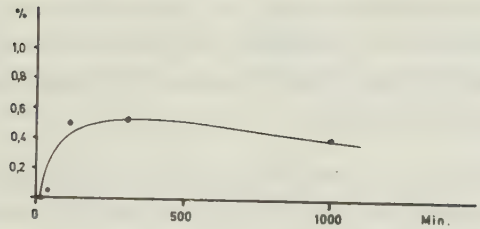


Abb. 3

Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Fluoroformylon in der Epidermis.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vitro Untersuchung.

1 b) Penetration von Fluoroformylon in vivo:

Die Ergebnisse zur Penetration von Fluoroformylon am Patienten wurden von Stüttgen und Schaefer (10) publiziert und werden hier zum Vergleich herangezogen. Sie sind in der Tab. III und IV zusammengestellt.

Auch diese Tabellen zeigen, vor allen Dingen wenn die Verhältnisse in der Epidermis und der Cutis betrachtet werden, daß nach 100 Min. schon das Penetrationsmaximum in etwa erreicht ist.

Insgesamt sind maximal ca. 43 % der aufgetragenen Menge penetriert. Auch hier ist der größte Anteil in der Hornschicht wiederzufinden.

Wie jedoch ein Vergleich von Tab. II mit Tab. IV zeigt, hat sich die prozentuale Verteilung in den einzelnen Schichten deutlich geändert.

Tab. III

Penetration von Fluoroformylon in vivo, % der aufgetragenen Menge

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
90'	Pat. A	31.1	1.64	1.57
120'	Pat. B	16.13	0.1	0.19
300'	Pat. C	19.67	0.45	0.52
720'	Pat. D	40.25	1.18	1.57

Tab. IV

Penetration von Fluoroformylon in vivo in Prozent der insgesamt in den einzelnen Schichten wiedergefundenen Aktivitäten

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
90'	Pat. A	90.6	4.8	4.6
120'	Pat. B	98.2	0.6	1.2
300'	Pat. C	95.3	2.2	2.5
720'	Pat. D	90.04	2.66	3.52

Es verbleiben in vivo nicht mehr über 98 %, sondern nur mehr 90 % in der Hornschicht. Relativ dazu nimmt die Menge in der Epidermis und Cutis deutlich zu.

In Abb. 4 sind wiederum die Aktivitäten in der Hornschicht in Abhängigkeit von der Applikationsdauer aufgetragen. Ebenso zeigt Abb. 5 diese Aktivitäten in der Epidermis. Damit ergibt sich in vivo zwar in etwa die gleiche Penetrationszeit mit einem Maximum von ca. 100 Min. und einer maximalen Penetration von ca. 43 %, jedoch sind die Verhältnisse in Bezug auf die einzelnen Schichten andere als die in den in vitro-Versuchen, in denen relativ gesehen weniger in der Hornschicht und mehr in Epidermis und Cutis wiedergefunden werden.

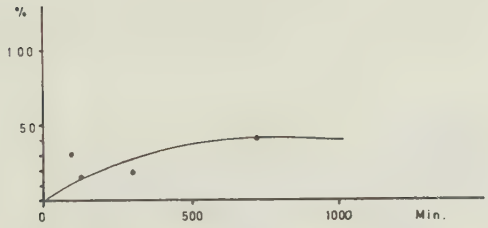


Abb. 4

Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Fluoroformylon in der Hornschicht.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vivo-Untersuchung ohne Occlusion.

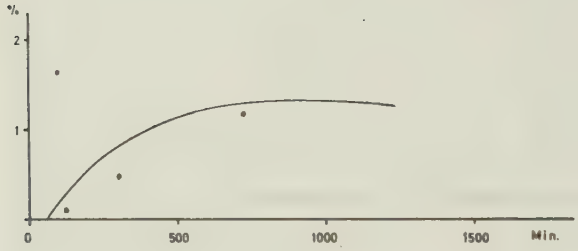


Abb. 5

Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Fluoroformylon in der Epidermis.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vivo-Untersuchung ohne Occlusion.

2 a) Penetration von Distamycin in vitro:

Die Untersuchungen wurden völlig gleichartig wie beim Fluoroformylon beschrieben durchgeführt. Auch die Penetrationszeiten waren annähernd dieselben. Zusätzlich wurde eine extrem lange Versuchszeit von über 2000 Min. verwandt.

In der Hornschicht ist kein deutlicher Zeitgang in Bezug auf die Penetrationsquote zu erkennen. Die Verhältnisse in der Epidermis und Cutis zeigen jedoch, daß von einem Penetrationsmaximum erst nach ca. 1000 Min. gesprochen werden kann.

In der Cutis nimmt anschließend die Aktivität noch geringfügig zu. Erst nach 100 Min. ist eine eindeutige Penetration in die Epidermis und Cutis festzustellen.

Die Tab. VI zeigt, daß bei kürzeren Versuchszeiten der größte Anteil des Antibioticums wiederum in der Hornschicht verbleibt. Erst nach 1000 bzw. über 2000 Min. wird von dort aus eine steigende Penetration in die tieferen Schichten beobachtet, die anscheinend auch zum höchsten Zeitpunkt noch nicht beendet ist.

Tab. V

Penetration von Distamycin in vitro

Wiedergefundene Aktivitäten in den einzelnen Schichten in Prozent der aufgetragenen Aktivität

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
15'	9	82.99	0.01	0
35'	8	59.1	0	0
105'	7	65.8	0.53	0.62
305'	10	80.6	0.39	0.24
1005'	11	52.5	1.77	1.65
2165'	12	25.7	1.70	2.23

Tab. VI

Penetration von Distamycin in vitro

Prozentuale Verteilung der Aktivitäten im Verhältnis zum gesamt penetrierten Distamycin gleich 100 %

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
15'	9	99.99	0.01	0
35'	8	100.0	0	0
105'	7	98.3	0.78	0.93
305'	10	99.2	0.48	0.30
1005'	11	94.0	3.16	2.95
2165'	12	86.7	5.74	7.53

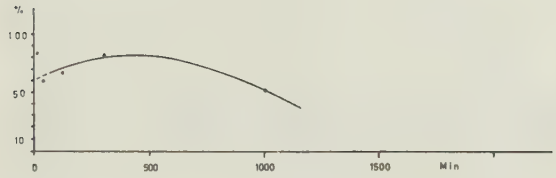


Abb. 6

Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Distamycin in der Hornschicht.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vitro-Untersuchung.

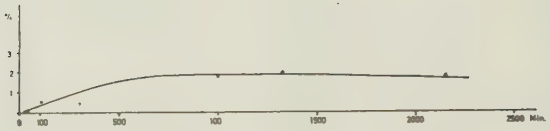


Abb. 7

Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Distamycin in der Epidermis.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vitro-Untersuchung.

Diese Relationen werden durch Abb. 6 und Abb. 7 verdeutlicht.

Man erkennt, daß das Penetrationsmaximum in der Epidermis bei ca. 1000 Min. liegt, daß danach aber die Penetration gleichmäßig fortschreitet. Dagegen steigen die Aktivitäten in der Cutis weiter an, siehe Tab. V.

Insgesamt ist damit die Penetrationsgeschwindigkeit von Distamycin im Vergleich zum Fluoroformylon in vitro deutlich verzögert mit einem Maximum von ca. 1000 Min. und einer Penetrationsquote von maximal ca. 80 %.

2 b) Penetration von Distamycin in vivo

Wie die Tab. VII zeigt, sind die Penetrationsquoten in vivo erheblich geringer als in vitro. Es stellt sich auch eine völlig geänderte Verteilung ein. So ist zwar das Maximum offensichtlich wiederum nach ca. 1000 Min. erreicht, wie vor allem die Resultate in der Epidermis und Cutis zeigen.

Tab. VII

Penetration von markiertem Distamycin in vivo in Prozent der aufgetragenen Menge

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
120'	15 offen	8.15	2.15	2.22
300'	18 offen	19.3	2.21	2.44
1050'	13 offen	9.86	2.92	2.22

Tab. VIII

Penetration von Distamycin in vivo in Prozent der wiedergefundenen Menge

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
120'	15 offen	65.05	17.18	17.80
300'	18 offen	80.6	9.24	10.2
1050'	13 offen	65.9	19.5	14.8

In der Hornschicht werden aber nur maximal 20 % der aufgetragenen Menge wiedergefunden, so daß insgesamt eine maximale Penetrationsquote von ca. 24 % abzulesen ist.

Auch bei Tabelle VIII ist vor allem der Vergleich mit den in vitro erhaltenen Ergebnissen (Tab. VI) interessant, der wiederum deutlich verschobene Verhältnisse zeigt.

So sind schon nach 120 Min. nur noch 65 % der gesamten Aktivität in der Hornschicht, während jeweils ca. 17 - 18 % in der Epidermis und Cutis aufzufinden sind. Damit ist in vivo die Penetration zwar in Bezug auf das Maximum deutlich beschleunigt, jedoch sind die absoluten und auch die relativen Mengen in der Hornschicht und Cutis niedriger.

Eine Verdeutlichung dieser Verhältnisse geben wieder die Abb. 8 und 9.

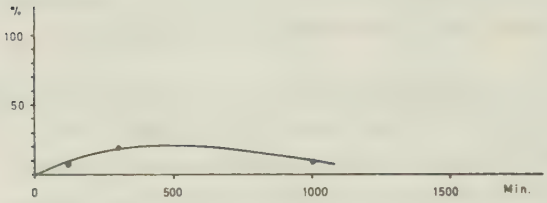


Abb. 8

Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Distamycin in der Hornschicht.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vivo-Untersuchung ohne Occlusion.

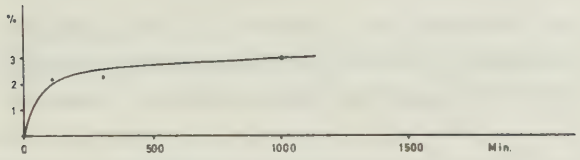


Abb. 9

Ordinate = % der wiedergefundenen Aktivität von Distamycin in der Epidermis.

Abszisse = Zeitpunkt der Aufarbeitung nach entsprechender Penetrationsdauer in Minuten; in vivo-Untersuchung ohne Occlusion.

Diskussion:

Stellt man nun insgesamt einen Vergleich zwischen den in vivo und in vitro erhaltenen Ergebnissen für Fluoroformylon und Distamycin an, so erkennt man, daß die Penetrationsquoten und Maxima in vitro nicht die gleichen sind wie in vivo. Ebensowenig ließ sich ein konstanter Faktor aufstellen, der ein Verhältnis zwischen der Penetration in vitro und der in vivo angibt und der für beide Substanzen gültig ist. Da zumindest für Distamycin die Penetrationsraten in vivo völlig andere sind als die in vitro, muß generell die Möglichkeit bezweifelt werden, von Untersuchungen an excidierter Haut auf die Penetrationskinetik eines Medikamentes an der lebenden Haut zurückschließen zu können, denn wie beim Distamycin ist für jede unbekannte Substanz zunächst zu erwarten, daß am Patienten andere Verteilungsrelationen erhalten werden, als sie im in vitro-Experiment vorliegen.

Zur Verdeutlichung wurde in zwei Fällen das Distamycin unter Occlusion in vivo appliziert. Theoretisch wäre zu erwarten gewesen, daß hierdurch die Penetrationsraten in Epidermis und Cutis erheblich gesteigert werden, da die Occlusion eine Mazeration der Haut, d. h. eine Aufweichung der Hornschicht bedingt und damit allgemein die Bedingungen für eine Penetration begünstigt werden.

Tab. IX und X zeigen jedoch, daß dies auf Distamycin nicht

zutrifft.

Die Penetrationsraten wurden weder für die Hornschicht, noch für die Epidermis und Cutis verstärkt oder verschoben.

Tab. IX
Distamycin, % der aufgetragenen Menge in vivo unter Occlusion.

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
125'	16 geschl.	18.4	2.44	1.41
1050'	14 geschl.	12.0	3.04	2.21

Tab. X
Distamycin, % der wiedergefundenen Menge in vivo unter Occlusion.

Zeit	Versuch Nr.	Hornsch.	Epid.	Cutis
125'	16 geschl.	82.7	10.9	6.34
1050'	14 geschl.	69.6	17.65	12.79

Vergleiche Tab. VII und VIII.

Vergleicht man weiterhin die Penetrationskinetik der beiden Substanzen in vivo im Verhältnis zueinander, so sind hier die Ergebnisse nicht deutlich unterschieden. Fluoroformylon zeigt ein Penetrationsmaximum bei ca. 100 Min. (vgl. Tab. III und IV), das gleiche gilt in etwa für Distamycin. Hier hat offensichtlich die unterschiedliche chemische Struktur der Substanzen keinen entscheidenden Einfluß auf den Weg und die Geschwindigkeit durch die Haut.

Über den Weg, d. h. zum Beispiel über das Verhältnis von perifolliculärer Penetration zu der durch die einzelnen Hautschichten, läßt sich auf Grund dieser Untersuchungen nichts aussagen. Derartige Fragen lassen sich nur mit Hilfe autoradiographischer Techniken beantworten. Es tritt jedoch klar zutage, daß das Antibioticum mit einer polypeptidartigen Struktur und der dadurch bedingten großen Polarität in seiner Penetration nicht unbedingt wesentlich verzögert wird. Theoretisch wäre zu erwarten, daß es an Eiweißstrukturen gebunden wird, zur weiteren Penetration jeweils desorbiert werden muß, in der folgenden Schichttiefe wieder adsorbiert wird usw., insgesamt also eine verzögerte Penetration zeigt. Für das Corticosteroid gilt dies vergleichsweise in viel geringerem Maße, obwohl hier zumindest die Formylgruppe eine im Vergleich zu anderen fluorierten Steroiden (z. B. dem Fluocinolonacetomid) eine recht polare Gruppe darstellt, insgesamt im Vergleich zum Distamycin jedoch als erheblich unpolarer zu bezeichnen ist. So muß die im Vergleich zum Steroid sogar höhere Penetrationsrate des Distamycin als über-

raschendes Ergebnis festgehalten werden.

Hier wäre ein eventueller Einfluß der Salbengrundlagen auf das Ergebnis zu diskutieren.

Aufgrund unterschiedlicher Löslichkeitsverhältnisse, vor allem jedoch weil Distamycin wegen schneller Hydrolyse nur in wasserfreie Grundlagen eingearbeitet werden kann, war ein Vergleich der Penetration beider Substanzen aus derselben Grundlage nicht möglich.

Im Sinne der Einleitung ergeben sich damit folgende Resultate:

1.) Der hier dargestellte Vergleich von in vitro- zu in vivo-Kinetiken läßt weder direkt noch über einen Umrechnungsfaktor Korrelationen zwischen den beiden Techniken zu.

2.) Unterschiedliche molekulare Strukturen bedingen nicht unbedingt unterschiedliche absolute Penetrationsmengen, wenn sie in geeignete Grundlagen eingearbeitet werden.

3.) Eine spezifische Anreicherung in bestimmten Schichten der Haut läßt sich für beide Substanzen nicht belegen, jedoch wird bei einem Vergleich der Volumenverhältnisse der Hornschicht, Epidermis und Cutis eine zu erwartende Verteilung mit den höchsten Konzentrationen in der Hornschicht und niedrigsten Mengen in der Cutis beobachtet. Die Konzentrationen in der obersten Lage resultieren naturgemäß aus den Diffusionsgesetzen, indem hier die Substanz aufgebracht wurde und von hier aus in die Tiefe

penetrierte. Beim Vergleich der Werte von Epidermis und Cutis ist zu beachten, daß die letztere ein mehr als zehnfaches Volumen hat.

4.) Eine Aussage über die therapeutische Wirksamkeit ist aus diesen Untersuchungen nicht zulässig, sondern kann nur über klinische Untersuchungen festgestellt werden.

5.) Untersuchungen zur Penetrationskinetik legen die Grundlagen zu klinisch-therapeutischen Fragestellungen, indem sie die quantitativen Zusammenhänge zwischen lokaler Applikation und dem Zeit-Konzentrationsdiagramm in definierten Hautschichten feststellen.

Zusammenfassung:

Zwei in ihrer chemischen Struktur grundlegend verschiedene radiomarkierte Substanzen, das Corticosteroid Fluoroformylon und das Antibioticum Distamycin wurden hinsichtlich ihrer Penetrationskinetik in der Haut in vitro und in vivo untersucht.

Nach unterschiedlichen Applikationszeiten wurde die Haut jeweils in einzelne Schichten horizontal zerlegt.

Hierbei soll erkennbar werden, ob in vitro-Untersuchungen eine verläßliche Projektion auf in vivo-Verhältnisse zulassen. Die Ergebnisse zeigen, daß dies nicht der Fall ist, da weder analoge noch proportionale Penetrationsraten beobachtet werden.

So ergab sich vor allem bei den Untersuchungen mit Distamycin in vivo eine deutlich niedrigere, aber beschleunigte Penetrationsrate als in vitro. Fluoroformylon penetriert jedoch in vivo erheblich stärker als in vitro.

Proportionale Penetrationsraten müßten aber zumindest einen für mehrere Substanzen konstanten und gleichsinnigen Faktor für die Umrechnung der in vitro-Ergebnisse auf die in vivo-Verhältnisse erkennen lassen.

Weiterhin zeigte sich, daß die unterschiedliche chemische

Struktur nicht den theoretisch zu erwartenden Einfluß auf die Penetrationsraten hatte. Hier wäre die Auswirkung der Grundlagen auf die Penetrationsraten zu diskutieren. Entsprechende, vergleichende Untersuchungen waren jedoch wegen der chemischen Eigenschaften der Substanzen nicht möglich.

Eine spezifische Anreicherung in bestimmten Hautschichten wurde nicht beobachtet. Vielmehr entspricht die Substanzverteilung hier in etwa den Diffusionsgesetzen mit einem stark abfallenden Gradienten von der Hornschicht über die Epidermis zur Cutis.

1 Tregear, R. T.
Physical Functions of Skin
Academic Press London, New York 1966

2 Blank, I. H. and Scheulein, R. J.
Stoughton, R. B., Tregear, R. T.
McKenzie, A. W., Vickers, C. F. H.
in
Progress in the Biological Science
in Relation to Dermatology, Bd. 2
A. Rook and R. H. Champion edd.
Cambridge University Press 1964

3 McKenzie, A. W. and Stoughton, R. B.
Method for composing percutaneous
absorption of Steroids. Arch. Derm. 86
(1962 608

4 Tronnier, H.
Vergleich zwischen der vasoconstricto-
rischen und antientzündlichen Wirkung
verschiedener Corticosteroide.
XIII. congr. Int. Derm. München
Springer Verlag Berlin, Heidelberg,
New York 1968 p. 172

5 Feldmann, R. J. and Maibach, H. J.
Percutaneous Penetration of Steroids
in Man. J. Invest. Derm. 52 (1969) 89

6 Hsia, S. L. and Hao, Y. L.
Identification of Metabolites of Hydro-
cortison-^{14}C in human skin.
Fed. Proc. 24 (1965) 574

7 Hsia, S. L. and Hao, Y. L.
Transformation of Cortisone to Cortisol
in Human Skin. Steroids 10 (1967) 489

8 Ainsworth, M.
Methods for measuring percutaneous
absorption. J. Soc. Cosm. Chem. 11 (1960) 69

9 Stüttgen, G. und Krause, H.
Die percutane Absorption von Tritium-
markiertem Panthenol bei Mensch und Tier.
Arch. klin. exp. Derm. 209 (1960) 578

10 Stüttgen, G.
die Haut als Resorptionsorgan in pharmakokinetischer Sicht.
Arzneimittelforschung 22 (1972) 324

11 Zesch, A. und Schaefer, H.
Das Penetrationsverhalten verschiedener radiomarkierter Steroide in der menschlichen Haut. In Vorbereitung.

Herzlichen Dank möchte ich Herrn Dr. Schaefer sagen, dem Leiter des Forschungslabors der Hautklinik im Rudolf-Virchow-Krankenhaus, für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 18.12. 1933 wurde ich als Sohn des Dr.-Ing. Otto Dietzmann und seiner Ehefrau Ursula, geb. Grovermann, in Berlin geboren.

Von 1940-1944 besuchte ich die Grundschule und von 1944-1953 die Oberschule in Berlin, wo ich am 2.2. 1953 das Abitur bestand.

Mein erstes Semester der Humanmedizin begann ich im Winter 1953/54 in Freiburg.
Mein Physikum bestand ich in Berlin am 4.4. 1957, das Staatsexamen am 12.8. 1961 ebenfalls in Berlin.

Nach der Tätigkeit als Medizinalassistent arbeitete ich seit dem 1.9. 1964 als Stationsarzt einer internen Station im Krankenhaus Hohengatow, wo ich am 26.11. 1969 die Facharztanerkennung erhielt.
Seit dieser Zeit habe ich als Praxisvertreter gearbeitet. Anfang 1973 möchte ich eine eigene Praxis eröffnen.

Berlin, den 22.12. 1972

B. Ladewig · Dissertationsdruck · 1 Berlin 12 Pestalozzistraße 106
Tel.: 312 88 85 - 313 81 98